





© BSN 2014

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Manggala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Acuan normatif.....	1
3 Istilah dan definisi	1
4 Komposisi	1
5 Syarat mutu	2
6 Pengambilan contoh	2
7 Cara uji	2
8 Syarat lulus uji	3
9 Higiene.....	3
10 Pengemasan.....	3
11 Syarat penandaan	3
Lampiran A (normatif) Cara uji teh hitam celup	4
Bibliografi	30

Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) *Teh hitam celup* ini merupakan revisi dari SNI 01-3753-1995, *Teh hitam celup*. Standar ini direvisi dan dirumuskan dengan tujuan sebagai berikut:

- Menyesuaikan standar dengan perkembangan teknologi terutama dalam persyaratan mutu dan metode uji;
- Menyesuaikan standar dengan peraturan-peraturan baru yang berlaku;
- Melindungi kesehatan konsumen;
- Menjamin perdagangan pangan olahan yang jujur dan bertanggung jawab;
- Mendukung perkembangan produk industri teh.

Standar ini dirumuskan dengan memperhatikan ketentuan pada :

1. Undang-Undang Republik Indonesia No. 5 Tahun 1984 tentang Perindustrian.
2. Undang-Undang Republik Indonesia No. 7 Tahun 1996 tentang Pangan.
3. Undang-Undang Republik Indonesia No. 8 Tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen.
4. Undang-Undang Republik Indonesia No. 36 Tahun 2009 tentang Kesehatan.
5. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No. 69 Tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan.
6. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No. 28 Tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu, dan Gizi Pangan.
7. Peraturan Menteri Perindustrian Republik Indonesia No.75/M-IND/PER/7/2010 tentang Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik.
8. Peraturan Menteri Kesehatan No.033/MENKES/PER/VII/2012 tentang Bahan Tambahan Makanan.
9. Surat Keputusan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK.00.05.52.4040 Tahun 2006 tentang Kategori Pangan.
10. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK.00.06.1.52.4011 Tahun 2009 tentang Penetapan Batas Maksimum Cemarkan Mikroba dan Kimia dalam Makanan.
11. Peraturan Direktur Jenderal Industri Agro No.30/IA/Per/12/2011, tentang Petunjuk Teknis Penilaian Penerapan Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik.

Standar ini dirumuskan oleh Subpanitia Teknis 67-04-S1 Minuman, yang telah dibahas melalui rapat teknis, dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 12 November 2012 di Jakarta. Hadir dalam rapat tersebut wakil dari konsumen, produsen, lembaga pengujian, lembaga ilmu pengetahuan dan teknologi, Badan Pengawas Obat dan Makanan, dan instansi terkait lainnya.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 24 Mei 2013 sampai 23 Juli 2013 dengan hasil akhir RASNI

Teh hitam celup

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan istilah dan definisi, syarat mutu, pengambilan contoh, dan cara uji teh hitam celup.

2 Acuan normatif

SNI 0428, *Petunjuk pengambilan contoh padatan*.

3 Istilah dan definisi

3.1

teh hitam celup

teh kering hasil pengolahan pucuk daun muda dan daun muda dari tanaman teh (*Camellia sinensis* L.) yang telah melalui proses oksidasi enzimatis dan dikemas dalam kantong dengan atau tanpa tali maupun perekat untuk dicelup dengan atau tanpa bahan pangan lain dan bahan tambahan pangan yang diizinkan

3.2

kantong

bahan yang digunakan untuk membungkus teh kering dengan tujuan untuk dicelup, yang terbuat dari kertas atau nilon, atau kain atau bahan lain yang memenuhi standar tara pangan (*food grade*)

3.3

tali pengikat

benang katun atau bahan lain yang memenuhi standar tara pangan (*food grade*) yang dipakai untuk mengikat

3.4

perekat

kawat aluminium atau bahan perekat lain yang memenuhi standar tara pangan (*food grade*)

4 Komposisi

4.1 Bahan baku

Daun dari tanaman teh (*Camelia sinensis* L.)

4.2 Bahan pangan lain

Bahan pangan yang diizinkan untuk teh hitam celup sesuai dengan ketentuan yang berlaku.

4.3 Bahan tambahan pangan

Bahan tambahan pangan yang diizinkan untuk teh hitam celup sesuai dengan ketentuan yang berlaku.

5 Syarat mutu

Syarat mutu teh hitam celup sesuai Tabel 1 di bawah ini.

Tabel 1 – Syarat mutu teh hitam celup

No.	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
1	Keadaan air seduhan		
1.1	Warna	-	Merah kecoklatan
1.2	Bau	-	khas teh
1.3	Rasa	-	khas teh
2	Kadar air (b/b)	%	Maks. 10
3	Kadar abu total (b/b)	%	4-8
4	Kadar abu larut dalam air terhadap abu total (b/b)	%	Min. 45
5	Kadar abu tidak larut dalam asam (b/b)	%	Maks. 1,0
6	Kealkalian abu larut dalam air (b/b)	%	1,0 - 3,0
7	Serat kasar (b/b)	%	Maks.16,5
8	Ekstrak dalam air (b/b)	%	Min. 32
9	Polifenol	%	Min. 9
10	Cemaran logam		
10.1	Kadmium (Cd)	mg/kg	Maks. 0,2
10.2	Timbal (Pb)	mg/kg	Maks.2,0
10.3	Timah (Sn)	mg/kg	Maks. 40,0
10.4	Merkuri (Hg)	mg/kg	Maks. 0,03
11	Cemaran Arsen (As)	mg/kg	Maks.1,0
12	Cemaran mikroba		
12.1	Angka Lempeng Total	koloni/g	Maks. 3×10^3
12.2	Kapang	koloni/g	Maks. 5×10^2

6 Pengambilan contoh

Cara pengambilan contoh sesuai dengan SNI 0428.

7 Cara uji

Cara uji untuk teh hitam celup seperti di bawah ini:

- Persiapan contoh sesuai Lampiran A.1
- Cara uji keadaan air seduhan sesuai Lampiran A.2
- Cara uji kadar air sesuai Lampiran A.3

- d) Cara uji kadar abu total sesuai Lampiran A.4
- e) Cara uji kadar abu larut dalam air terhadap abu total sesuai Lampiran A.5
- f) Cara uji kadar abu tidak larut dalam asam sesuai Lampiran A.6
- g) Cara uji kealkalian abu larut dalam air sesuai Lampiran A.7
- h) Cara uji serat kasar sesuai Lampiran A.8
- i) Cara uji ekstrak dalam air sesuai Lampiran A.9
- j) Cara uji polifenol sesuai Lampiran A.10
- k) Cara uji cemaran logam sesuai Lampiran A.11
 - Cara uji kadmium (Cd) dan timbal (Pb) sesuai Lampiran A.11.1
 - Cara uji timah (Sn) sesuai Lampiran A.11.2
 - Cara uji merkuri (Hg) sesuai Lampiran A.11.3
- l) Cara uji cemaran arsen (As) sesuai Lampiran A.12
- m) Cara uji cemaran mikroba sesuai Lampiran A.13
 - Persiapan dan homogenisasi contoh sesuai Lampiran A.13.1
 - Cara uji angka lempeng total sesuai Lampiran A.13.2
 - Cara uji kapang sesuai Lampiran A.13.3

8 Syarat lulus uji

Produk dinyatakan lulus uji apabila memenuhi syarat mutu sesuai Tabel 1.

9 Higiene

Cara memproduksi produk yang higienis termasuk cara penyiapan dan penanganannya sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang Pedoman Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik.

10 Pengemasan

Teh hitam celup dikemas dalam wadah yang tertutup rapat, tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, aman selama penyimpanan dan pengangkutan.

11 Syarat penandaan

Syarat penandaan sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang label dan iklan pangan.

Lampiran A
(normatif)
Cara uji teh hitam celup

A.1 Persiapan contoh

Persiapan contoh terdiri atas persiapan contoh untuk uji mikrobiologi, uji organoleptik dan uji kimia. Pengambilan contoh untuk uji mikrobiologi dilakukan pertama, kemudian dilanjutkan dengan pengambilan contoh untuk uji organoleptik dan uji kimia

A.1.1 Persiapan contoh untuk uji mikrobiologi

Buka kemasan contoh teh hitam celup, secara aseptik keluarkan teh hitam dari kantongnya dan ambil sebanyak 150 g, kemudian tempatkan dalam botol contoh steril.

A.1.2 Persiapan contoh untuk uji organoleptik

Buka kemasan contoh teh hitam celup dan ambil contoh teh hitam celup secukupnya kemudian tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering

A.1.3 Persiapan contoh untuk uji kimia

Buka kemasan teh hitam celup, keluarkan teh hitam dari kantongnya kemudian tempatkan kedalam botol contoh yang bersih dan kering.

A.2 Keadaan air seduhan

A.2.1 Prinsip

Pengamatan contoh uji dengan indera penglihatan, penciuman, dan pengecap (lidah) yang dilakukan oleh panelis yang mempunyai kompetensi pengujian organoleptik.

A.2.2 Cara kerja

- a) Masukkan 1 kantong contoh (± 2 g) ke dalam gelas piala 300 mL, kemudian tambahkan air mendidih sebanyak 200 mL;
- b) biarkan selama 5 menit sambil gerakkan kantong naik turun dalam air;
- c) keluarkan kantong dan biarkan larutan sampai suhu kamar;
- d) lakukan pengujian organoleptik yang meliputi warna, bau dan rasa dengan indera penglihatan, penciuman, dan pengecap (lidah); dan
- e) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli

A.2.3 Cara menyatakan hasil

- a) Catat warna larutan;
- b) jika bau contoh sesuai dengan bau teh, maka dinyatakan "khas teh"; dan
- c) jika rasa contoh sesuai dengan rasa teh, maka dinyatakan "khas teh"

A.3 Kadar Air

A.3.1 Prinsip

Kadar air dihitung berdasarkan bobot yang hilang selama pemanasan dalam oven pada suhu $(105 \pm 2) ^\circ\text{C}$

A.3.2 Persiapan contoh

A.3.2 Peralatan

- Oven terkalibrasi dengan ketelitian $1 ^\circ\text{C}$;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Desikator yang berisi desikan; dan
- Cawan nikel, platina, atau aluminium bertutup

A.3.3 Cara kerja

- Panaskan cawan beserta tutupnya dalam oven dalam suhu $(105 \pm 2) ^\circ\text{C}$ selama lebih kurang satu jam dan dinginkan dalam desikator selama 20 menit sampai dengan 30 menit, kemudian timbang dengan neraca analitik (cawan dan tutupnya) (W_0);
- masukkan 5 g contoh ke dalam cawan, tutup dan timbang (W_1);
- panaskan cawan yang berisi contoh tersebut dalam keadaan terbuka dengan meletakkan tutup cawan di samping cawan di dalam oven pada suhu $(105 \pm 2) ^\circ\text{C}$ selama tiga jam;
- tutup cawan ketika masih di dalam oven, pindahkan segera ke dalam desikator dan dinginkan selama 20 sampai dengan 30 menit kemudian timbang;
- lakukan pemanasan kembali selama satu jam dan timbang sampai mencapai bobot yang tetap;
- lakukan pekerjaan duplo; dan
- hitung kadar air dalam contoh

A.3.4 Perhitungan

$$\text{Kadar air} = \frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \times 100\%$$

Keterangan: W_0 adalah bobot cawan kosong dan tutupnya, dinyatakan dalam gram (g);
 W_1 adalah bobot cawan, tutupnya dan contoh sebelum dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g);
 W_2 adalah bobot cawan, tutupnya dan contoh setelah dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g).

A.4 Kadar abu total

A.4.1 Prinsip

Destruksi bahan organik dengan pembakaran pada suhu $(525 \pm 25) ^\circ\text{C}$

A.4.2 Peralatan

- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian $1 ^\circ\text{C}$;
- Oven terkalibrasi dengan ketelitian $1 ^\circ\text{C}$;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik;
- Panangas air;

- f) Desikator yang berisikan desikan; dan
- g) Cawan pengabuan kapasitas 50 mL sampai 100 mL, terbuat dari platina, porselen atau bahan lain yang tidak terpengaruh oleh kondisi pengujian

A.4.3 Cara kerja

- a) Panaskan cawan dalam tanur pada suhu $(525 \pm 25) ^\circ\text{C}$ selama lebih kurang satu jam dan dinginkan dalam desikator selama 30 menit kemudian timbang dengan neraca analitik (W_0);
- b) timbang dengan teliti sampel sebanyak 5 g contoh, masukkan ke dalam cawan dan timbang (W_1);
- c) panaskan cawan yang berisi contoh tersebut dalam oven pada suhu $(105 \pm 2) ^\circ\text{C}$ sampai air hilang;
- d) panaskan cawan yang berisi contoh yang telah dikeringkan di atas pemanas listrik hingga terbentuk arang (pemanasan secara bertahap dari panas kecil);
- e) tempatkan cawan yang berisi contoh tersebut dalam tanur pada suhu $(525 \pm 25) ^\circ\text{C}$ sampai terbentuk abu berwarna putih;
- f) tambahkan air ke dalam abu, keringkan dalam penangas air kemudian lanjutkan pada pemanas listrik kemudian abukan kembali pada suhu $(525 \pm 25) ^\circ\text{C}$ sampai mencapai bobot yang tetap;
- g) pindahkan segera ke dalam desikator dan dinginkan selama 30 menit kemudian timbang (W_2);
- h) lakukan pekerjaan duplo, dan
- i) hitung kadar abu total dalam contoh.

A.4.4 Perhitungan

$$\text{Kadar abu total (\%)} = \frac{W_2 - W_0}{W_1 - W_0} \times 100\%$$

Keterangan:

W_0 adalah bobot cawan kosong, dinyatakan dalam gram (g);

W_1 adalah bobot cawan dan contoh sebelum diabukan, dinyatakan dalam gram (g);

W_2 adalah bobot cawan dan contoh setelah diabukan, dinyatakan dalam gram (g).

A.4.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar abu total. Jika kisaran lebih besar dari 5 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.5 Kadar abu larut dalam air terhadap abu total

A.5.1 Prinsip

Ekstraksi abu total dengan air panas, penyaringan dengan kertas saring tak berabu, pengabuan, dan penimbangan residu untuk menentukan abu tak larut dalam air. Abu larut dalam air adalah selisih antara abu total dengan abu tak larut dalam air.

A.5.2 Peralatan

- a) Tanur terkalibrasi dengan ketelitian $1 ^\circ\text{C}$;
- b) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- c) Panangas air;

- d) Kertas saring tak berabu;
- e) Desikator yang berisikan desikan; dan
- f) Cawan platina, kuarsa atau porselen yang berukuran 50 mL sampai 100 mL.

A.5.3 Cara kerja

- a) Contoh yang digunakan adalah abu yang berasal dari penentuan kadar abu total (W). Tambahkan 20 mL air suling ke dalam cawan yang berisi abu total, panaskan sampai hampir mendidih dan saring dengan kertas saring bebas abu;
- b) bilas cawan dan kertas saring beserta isinya dengan air panas hingga jumlah filtrat kira-kira 60 mL. Simpan filtrat untuk penetapan alkalinitas abu larut dalam air;
- c) pindahkan kertas saring dan isinya ke cawan semula, uapkan dengan hati-hati di atas penangas air;
- d) abukan dalam tanur listrik pada suhu $(525 \pm 25) ^\circ\text{C}$ sampai bebas karbon;
- e) pindahkan segera ke dalam desikator dan dinginkan selama 30 menit kemudian timbang (W_3). Ulangi pekerjaan sampai mencapai bobot yang tetap;
- f) lakukan pekerjaan duplo, dan
- g) hitung kadar abu larut dalam air.

A.5.4 Perhitungan

$$\text{Abu tak larut dalam air terhadap abu total (\%)} = \frac{W_3}{W} \times \frac{100}{100 - KA} \times 100\%$$

Keterangan:

W adalah bobot contoh pada penetapan abu total, dinyatakan dalam gram (g);

W_3 adalah bobot abu tak larut dalam air, dinyatakan dalam gram (g);

KA adalah kadar air, dinyatakan dalam %

$$\text{Abu larut dalam air} = \frac{W - W_3}{W} \times \frac{100}{100 - KA} \times 100\%$$

Keterangan:

W_3 adalah bobot abu tak larut dalam air, dinyatakan dalam gram (g);

W_4 adalah bobot abu total, dinyatakan dalam gram (g)

A.5.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar abu larut dalam air dari abu total. Jika kisaran lebih besar dari 5 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.6 Kadar abu tidak larut dalam asam

A.6.1 Prinsip

Perlakuan abu total dengan larutan asam klorida, penyaringan, pengabuan dan penimbangan residu.

A.6.2 Peralatan

- a) Tanur terkalibrasi dengan ketelitian $1 ^\circ\text{C}$;
- b) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- c) Panangas air;
- d) Kertas saring tak berabu;
- e) Desikator yang berisikan desikan; dan
- f) Cawan platina, kuarsa atau porselen yang berukuran 50 mL sampai 100 mL.

A.6.3 Pereaksi

- a) Larutan asam klorida (HCl) 10% (v/v);
pipet 10 mL asam klorida pekat, kemudian tambahkan air suling sebanyak 25 mL dan homogenkan;
- b) Perak nitrat (AgNO_3) (17 gram/ liter larutan).

A.6.4 Cara kerja

- a) Contoh uji merupakan abu tak larut dalam air (W_3)
- b) tambahkan 25 mL HCl 10% ke dalam cawan yang berisi contoh pada butir a, tutup cawan untuk menghindari percikan dan didihkan larutan hati-hati selama sepuluh menit di atas penangas air;
- c) dinginkan dan saring larutan menggunakan kertas saring tak berabu. Bilas menggunakan air panas hingga air pencuci bebas dari asam. Hal ini dapat diuji dengan larutan AgNO_3 ;
- d) tempatkan kembali kertas saring dan isi ke dalam cawan, uapkan hati-hati di atas penangas air yang mendidih, kemudian panaskan dalam tanur pada suhu $(525 \pm 25)^\circ\text{C}$, hingga partikel bebas karbon;
- h) segera pindahkan dan dinginkan cawan ke dalam desikator selama 30 menit dan timbang (W_4). Ulangi pekerjaan sampai mencapai bobot yang tetap;
- e) lakukan pekerjaan duplo; dan
- f) hitung kadar abu tak larut dalam asam.

A.6.5 Perhitungan

$$\text{Kadar abu tak larut dalam asam (\%)} = \frac{W_4}{W_3} \times \frac{100}{100 - KA} \times 100$$

Keterangan:

W_4 adalah bobot contoh pada penetapan abu total, dinyatakan dalam gram (g);

W_3 adalah bobot abu tak larut dalam air, dinyatakan dalam gram (g).

KA adalah kadar air, dinyatakan dalam %

A.6.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar abu tak larut dalam asam. Jika kisaran lebih besar dari 5 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.7 Kealkalian abu larut dalam air (sebagai KOH)**A.7.1 Prinsip**

Titrasi hasil saringan yang diperoleh dari penetapan abu yang larut dalam air dengan larutan asam klorida dan indikator metil jingga

A.7.2 Peralatan

- a) Gelas piala 250 mL; dan
- b) Buret 50 mL.

A.7.3 Pereaksi

- a) Larutan asam klorida (HCl) 0,1 N;
- b) indikator metil jingga (0,5 g metil jingga per liter metanol); dan
- c) air suling.

A.7.4 Cara kerja

- a) Contoh yang digunakan adalah filtrat yang diperoleh dari penetapan kadar abu larut dalam air;
- b) tempatkan filtrat dalam gelas piala kemudian titrasi dengan larutan HCl 0,1 N menggunakan indikator metil jingga.

A.7.5 Perhitungan

$$\text{Alkalinitas abu larut dalam air (sebagai KOH) (\%)} = \frac{V \times N \times 0,0561}{W} \times \frac{100}{100 - KA} \times 100$$

Keterangan:

- W adalah bobot contoh pada penetapan abu total, dinyatakan dalam gram (g);
 V adalah volume larutan yang diperlukan untuk titrasi contoh, dinyatakan dalam mililiter (mL);
 N adalah normalitas larutan HCl.

A.8 Serat kasar**A.8.1 Prinsip**

Hidrolisis sampel dengan larutan asam sulfat dan larutan natrium hidroksida. Residu dipisahkan dengan penyaringan, pencucian, pengeringan, dan pengabuan. Bobot yang tertinggal dari hasil pengabuan dinamakan serat kasar.

A.8.2 Peralatan

- a) Oven terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- b) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- c) Desikator yang berisi desikan;
- d) Pemanas listrik;
- e) Pendingin;
- f) Corong *Buchner*;
- g) Pompa vakum;
- h) Kertas saring tak berabu yang mempunyai spesifikasi *particle retention liquid* sebesar 20-25 µm dan diameter 12,5 mm;
- i) Labu asah dengan kapasitas 1 L;
- j) Cawan gelas, dengan diameter 40 mm dan kapasitas 70 mL; dan
- k) Mortar;

A.8.3 Pereaksi

- a) Air suling;
- b) Larutan baku asam sulfat (H₂SO₄) (100 g asam sulfat per liter larutan);
 Larutkan 275 mL asam sulfat pekat (bj = 1,84 g/mL) ke dalam air suling, lalu tera hingga 5 000 mL.

- c) Larutan kerja asam sulfat (H₂SO₄) (12,5 g asam sulfat per liter larutan)
Larutkan 125 mL larutan baku asam sulfat (A.8.3b) ke dalam 1 000 mL air suling
- d) Larutan baku natrium hidroksida (NaOH) (100 g natrium hidroksida per liter larutan)
Larutkan 500 g natrium hidroksida ke dalam air, dinginkan, lalu tera hingga 5 000 mL.
- e) Larutan kerja natrium hidroksida (NaOH) (12,5 g natrium hidroksida per liter larutan)
Larutkan 125 mL larutan baku natrium hidroksida (A.8.3d) ke dalam 1 000 mL air suling
- f) Oktanol, sebagai antibusa
- g) Asam klorida (HCl) 1 % (persen volume)
Larutkan 10 ml asam klorida pekat ($\rho = 1,19 \text{ g/mL}$) ke dalam 1 000 mL air suling
- h) Etanol dengan kemurnian minimal 95 % (persen volume)
- i) Aseton

A.8.4 Cara kerja

- a) Haluskan contoh dengan mortar hingga lolos dalam ayakan 1 mm;
- b) timbang dengan teliti 2 gram sampai 3 gram contoh (W_0) ke dalam labu asah 1 L, tambahkan 200 mL larutan kerja H₂SO₄ (A.8.3 c) kemudian didihkan dengan pendingin tegak;
- c) tambahkan dua atau tiga tetes atibusa (A.8.3 f) ke dalam kondensor dan didihkan selama 2 menit. Lanjutkan selama 30 menit, putar labu untuk mencampurkan sampel dan memindahkan partikel yang berada di bagian sisi labu;
- d) siapkan corong Buchner dan kertas saring;
- e) dalam keadaan panas, saring dengan menggunakan corong *buchner* yang berisi kertas saring yang telah diketahui beratnya (W_1) ;
- f) bilas labu dengan menggunakan 50 mL air mendidih dan tuang ke penyaring
- g) cuci bahan yag tidak larut yang terdapat pada kertas saring dengan 200 mL larutan kerja NaOH (A.8.3 e), masukkan dalam labu asah 1 mL dan didihkan;
- h) tambahkan dua atau tiga tetes atibusa (A.8.3 f) ke dalam kondensor dan didihkan selama 30 menit sama seperti perlakuan menggunakan asam sulfat
- i) dalam keadaan panas, saring dengan menggunakan corong *buchner* yang berisi kertas saring
- j) cuci residu berturut-turut menggunakan 50 mL air mendidih, larutan asam klorida (A.8.3 g), dan air mendidih lagi. Terakhir, cuci residu dua kali dengan etanol dan tiga kali dengan aseton
- k) angkat kertas saring beserta isinya, masukkan ke oven dan keringkan pada suhu 103 °C selama 2 jam. Dinginkan dalam desikator dan timbang sampai bobot tetap (W_2);
- l) masukkan kertas saring beserta isi kedalam cawan pengabuan yang telah dipanaskan dalam tanur pada suhu $(525 \pm 25) ^\circ\text{C}$ dan diketahui bobotnya (W_3);
- m) panaskan cawan yang berisi endapan di atas pemanas listrik hingga terbentuk arang (pemanasan secara bertahap dari panas kecil);
- n) tempatkan cawan yang berisi contoh tersebut dalam tanur pada suhu $(525 \pm 25) ^\circ\text{C}$ sampai terbentuk abu bewarna putih;
- o) timbang sampai bobot tetap (W_4); dan
- p) lakukan pekerjaan duplo.

A.8.5 Perhitungan

$$\text{Serat kasar tanpa pengabuan (\%)} (A) = \frac{W_2 - W_1}{W} \times 100\%$$

$$\text{Abu serat (\%)} (B) = \frac{W_4 - W_3}{W} \times 100\%$$

Serat kasar (%) = A - B

Keterangan:

- W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
 W₁ adalah bobot kertas saring, dinyatakan dalam gram (g);
 W₂ adalah bobot kertas saring dan endapan, dinyatakan dalam gram (g).
 W₃ adalah bobot cawan kosong, dinyatakan dalam gram (g).
 W₄ adalah bobot cawan dan abu, dinyatakan dalam gram (g).

A.8.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil serat kasar. Jika kisaran lebih besar dari 5 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.9 Ekstrak dalam air

A.9.1 Prinsip

Kadar ekstrak dalam air dihitung dari bagian yang larut dalam air mendidih, disaring dan diuapkan. Hasil saringan dikeringkan dan ditimbang.

A.9.2 Peralatan

- Oven terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Panangas air;
- Desikator berisi desikan;
- Cawan, terbuat dari gelas borosilikat, dengan standar porositas P 160 (Indek ukuran pori > 160 µm), diameter 40 mm dan kapasitas 70 mL;
- Gelas penyaring berkapasitas 1 L untuk penyaringan vakum;;
- Labu ukur berukuran 500 mL;
- Pipet volumetrik berukuran 50 mL; dan
- Penyaring sampel

A.9.3 Cara kerja

- Panaskan cawan dalam oven pada suhu (105±2) °C selama lebih kurang satu jam dan dinginkan dalam desikator selama 20 menit sampai dengan 30 menit, kemudian timbang dengan neraca analitik (W₀);
- masukan contoh uji sebanyak 2 gram ke dalam gelas piala 300 mL (W₁);
- tambahkan 200 mL air mendidih dan diamkan selama 1 jam;
- saring ke dalam labu ukur 500 mL dan bilas dengan air panas sampai warna larutannya menjadi jernih atau bening, kemudian dinginkan dan tepatkan sampai tanda garis dengan air suling;
- pipet 50 mL filtrat ke dalam cawan yang telah diketahui bobotnya dan keringkan di atas penangas air;
- panaskan dalam oven selama dua jam, dinginkan dalam desikator dan timbang;
- panaskan kembali dalam oven selama satu jam, dinginkan dalam desikator dan timbang (W₂), ulangi pekerjaan sampai mencapai bobot yang tetap;
- lakukan pekerjaan duplo; dan
- hitung kadar ekstrak dalam air.

A.9.4 Perhitungan

$$\text{Kadar ekstrak dalam air (\%)} = \frac{W_2 - W_0}{W_1 - W_0} \times P \times \frac{100}{100 - KA} \times 100$$

Keterangan:

W_0 adalah bobot cawan kosong dan tutupnya, dinyatakan dalam gram (g);

W_1 adalah bobot cawan kosong, tutupnya, dan contoh uji, dinyatakan dalam gram (g);

W_2 adalah bobot cawan kosong, tutupnya, dan contoh terekstrak, dinyatakan dalam gram (g);

P adalah pengenceran; dan

KA adalah kadar air

A.9.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar ekstrak dalam air. Jika kisaran lebih besar dari 5 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.10 Kadar Polifenol

A.10.1 Prinsip

Polifenol diekstrak dari contoh uji daun teh menggunakan metanol 70% pada suhu 70 °C. Polifenol terekstrak diukur secara *colorimetric* menggunakan pereaksi Fenol Folin-Ciocalteu. Pereaksi mengandung asam fosfo-tungstat sebagai oksidan, dimana pada reaksi reduksi gugus hidroksi fenolat teroksidasi menghasilkan kompleks biru molibdenum-tungsten yang dibaca pada panjang gelombang 765 nm. Pereaksi Fenol Folin-Ciocalteu bereaksi dengan berbagai senyawa polifenol, meskipun reaksi dengan masing-masing jenis polifenol memberikan respon yang beragam, pemilihan asam galat sebagai standar kalibrasi dapat digunakan untuk mengukur kadar polifenol total.

A.10.2 Pereaksi

- Air suling;
- Metanol;
- Metanol 70% (fraksi volum);
tambahkann 700 mL metanol (A.10.2 b) ke dalam labu ukur 1 L, kemudian encerkan dengan air suling tepat 1 L dan kocok.
- Pereaksi Fenol Folin- Ciocalteu;
sebaiknya dicek linieritas kalibrasi terhadap asam galat untuk memastikan kelayakan dari pereaksi yang tersedia.
- Pereaksi Fenol Folin Ciocalteu 10% (fraksi volum);
pindahkan 20 mL Fenol Folin- Ciocalteu (A.10.2 d) menggunakan pipet ke dalam labu ukur 200 mL, tambahkan air dan tepatkan sampai tanda tera kemudian kocok. Siapkan larutan pereaksi Fenol Folin-Ciocalteu dalam kondisi baru setiap akan melakukan pengujian.
- Larutan sodium karbonat (Na_2CO_3) 7,5% (konsentrasi masa);
timbang $(37,50 \pm 0,01)$ gram Na_2CO_3 *anhidrat* ke dalam 500 mL labu ukur volumetrik. Tambahkan air suling hangat secara hati-hati sampai volumenya mencapai setengah volum labu ukur kemudian kocok, selanjutnya dinginkan larutan sampai suhu kamar dan encerkan sampai tanda tera.

CATATAN larutan ini akan tetap stabil pada suhu kamar selama satu bulan

- g) Larutan baku standar asam galat, 1000 µg/mL asam galat *anhidrat*; dan timbang ($0,110 \pm 0,001$) gram asam galat monohidrat (BM = 188,14) ke dalam labu ukur 100 mL, kemudian larutkan menggunakan air suling, encerkan sampai tanda tera dan kocok hingga homogen. Siapkan larutan standar dalam kondisi baru.

CATATAN untuk meningkatkan kelarutan asam galat dalam air suling, maka asam galat monohidrat harus dalam keadaan anhidrat. Standar asam galat harus bersertifikat level pereaksi, misalnya A.C.S (*American Chemical Society*) yang mencerminkan bahwa zat-zat kimia yang terkandung di dalamnya telah memenuhi spesifikasi pereaksi. Adapun jika tidak, maka harus ditentukan kadar airnya terlebih dahulu (pemanasan pada suhu 103 °C). Selanjutnya konsentrasi larutan baku standar asam galat anhidrat dapat dihitung.

- h) Larutan standar asam galat; pindahkan sejumlah larutan baku standar asam galat (A.11.2 g) menggunakan pipet sebagaimana yang tercantum pada Tabel A.1, kemudian encerkan sampai volumenya mencapai tanda tera labu ukur 100 mL dan kocok. Larutan standar ini harus dibuat pada hari yang sama dengan pelaksanaan pengujian.

Tabel A.1 – Larutan standar asam galat

Larutan asam galat standar	Volume stok larutan asam galat (mL)	Konsentrasi larutan standar yang diencerkan (µg/mL)
A	1,0	10
B	2,0	20
C	3,0	30
D	4,0	40
E	5,0	50

A.10.3 Peralatan

- Timbangan analitis terkalibrasi dengan ketelitian 0,001 gram;
- Penangas air terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C
- Dispenser atau pipet volum 5 mL;
- Sentrifuse, dengan kemampuan 3500 RPM;
- Spektrofotometer UV-Vis terkalibrasi;
- Pipet ukur;
- Labu ukur 100 mL, 200 mL, 500 mL, dan 1 L;
- Vortex mixer*;
- Tabung ekstraksi bertutup 10 mL ; dan
- Tabung reaksi bertutup berukuran 10 mL. (sebelum digunakan, tabung reaksi harus dicuci menggunakan asam nitrat (HNO₃), dan dibilas menggunakan air kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 100 °C).

A.10.4 Cara kerja

A.10.4.1 Pembuatan deret standar

- Pindahkan 1,0 mL masing-masing larutan standar asam galat A, B, C, D, E ke dalam gelas ukur 10 mL yang berbeda;
- masukkan 1,0 mL air suling ke dalam gelas ukur 10 mL sebagai larutan blanko;
- tambahkan 5,0 mL pereaksi Fenol Folin-Ciocalteu ke dalam masing-masing langkah a) dan b);

- d) dalam waktu 3 menit sampai 8 menit setelah penambahan Fenol Folin-Ciocalteu, tambahkan 4,0 mL larutan Na_2CO_3 7,5% (A.10.2 f) ke dalam masing-masing tabung, tutup dan kocok;
- e) diamkan pada suhu ruang sekitar 50 menit, kemudian ukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 765 nm;
- f) lakukan pekerjaan duplo;
- g) larutan blanko harus memiliki absorbansi $< 0,010$. Jika nilainya $>$ dari 0,010 menandakan adanya kontaminasi yang disebabkan kualitas air yang tidak sesuai standar atau peralatan;
- h) hitung masa standar asam galat anhidrat dalam masing-masing 1 mL larutan standar asam galat A, B, C, D, dan E, menggunakan persamaan berikut:

$$m (\mu\text{g/mL}) = \frac{(M_0 \times V \times w_{DM, \text{std}} \times 10000)}{100 \times 100}$$

Keterangan:

- M_0 adalah masa asam galat monohidrat yang digunakan untuk pembuatan larutan standar baku, dinyatakan dalam gram (g);
- V adalah volum larutan standar asam galat, dinyatakan dalam milliliter (mL);
- $w_{DM, \text{std}}$ adalah berat kering asam galat, dinyatakan dalam % (fraksi masa).

- i) buat grafik linieritas standar, masa asam galat anhidrat dalam standar A, B, C, D, dan E (μg) sebagai sumbu X dan absorbansi sebagai sumbu Y. Kurva kalibrasi harus linier. Perbedaan *slope* garis kalibrasi yang diperoleh harus mendekati 0,0001 untuk hasil perhitungan pekerjaan duplo. Kurva kalibrasi harus memiliki intersep yang mendekati aslinya. Jika nilai intersep yang diperoleh berdasarkan absorbansi y- axis $> \pm 0,04$, maka patut dicurigai. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh kandungan air dalam asam galat, persiapan larutan standar atau kalibrasi pipetnya.

A.10.4.2 Penentuan kadar polifenol

- a) Contoh uji digiling dan diaduk supaya homogen, kemudian dimasukkan ke dalam botol contoh tertutup dan hindarkan dari cahaya;
- b) timbang ($0,200 \pm 0,001$) gram contoh uji dalam tabung ekstraksi;
- c) panaskan methanol 70% (A.11.2 c) dalam penangas air pada suhu 70°C minimal selama 30 menit supaya terjadi kesetimbangan;
- d) panaskan tabung ekstraksi berisi teh dalam penangas air yang sama pada suhu 70°C , kemudian tambahkan methanol 70 % (A.11.2 c), tutup dan aduk dalam *vortex mixer*;
- e) panaskan kembali tabung ekstraksi berisi campuran contoh uji dan methanol 70% dalam penangas air pada suhu 70°C selama 10 menit, dan kocok menggunakan *vortex mixer* pada menit ke -5 dan ke -10 supaya proses ekstraksi berjalan sempurna;
- f) angkat tabung ekstraksi berisi campuran contoh uji dan metanol 70% dari penangas air dan dinginkan sampai suhu ruangan. Buka tutup tabung ekstraksi dan pusingkan tabung ekstraksi dalam sentrifuse dengan kecepatan 3500 rpm selama 10 menit
- g) pisahkan supernatan ke dalam tabung reaksi 10 mL;
- h) ulangi proses d) sampai f) campur hasil ekstraksi, tambahkan methanol 70% hingga volumenya mencapai 10 mL dan kocok;
- i) biarkan hasil ekstraksi g) pada suhu ruang. Ekstrak ini akan stabil selama 24 jam pada suhu 4°C ;
- j) pindahkan sebanyak 1,0 mL ekstrak contoh uji ke dalam labu ukur 100 mL, kemudian encerkan menggunakan air suling sampai tanda tera dan kocok;
- k) masukkan 1,0 mL ekstrak contoh uji yang telah diencerkan kedalam tabung reaksi 10 mL;
- j) tambahkan 5,0 mL pereaksi Fenol Folin-Ciocalteu;

- k) setelah 3 menit sampai 8 menit penambahan fenol folin-ciocalteu, tambahkan 4,0 mL larutan sodium karbonat (Na_2CO_3) ke dalam masing-masing tabung, tutup dan kocok;
- l) biarkan pada suhu ruang sekitar 50 menit, kemudian ukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 765 nm;
- m) lakukan pekerjaan duplo; dan
- n) ulangi pengujian secara *colorimetric*, dengan menaikkan tingkat pengenceran jika absorbansinya lebih tinggi dari absorbansi standar asam galat 50 μg (larutan standar asam galat E)

A.10.5 Perhitungan

$$\text{kadar polifenol (\%)} = \frac{(D_{\text{sampel}} - D_{\text{intersep}}) \times V_{\text{sampel}} \times d}{S_{\text{std}} \times m_{\text{sampel}} \times 10000 \times W_{\text{DM,sampel}}} \times 100\%$$

Keterangan:

D_{sampel}	adalah absorbansi larutan contoh;
D_{intersep}	adalah absorbansi yang diperoleh untuk konsentrasi larutan blanko;
S_{std}	adalah slope kurva kalibrasi;
m_{sampel}	adalah masa contoh uji, dinyatakan dalam gram (g);
V_{sampel}	adalah volume larutan ekstraksi contoh uji, dinyatakan dalam milliliter (mL);
d	adalah faktor pengenceran;
$W_{\text{DM,sampel}}$	adalah bobot sampel atas dasar bahan kering, dinyatakan dalam % (fraksi masa).

A.10.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar polifenol. Jika kisaran lebih besar dari 5 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.11 Cemaran logam

A.11.1 Kadmium (Cd) dan timbal (Pb)

A.11.1.1 Prinsip

Destruksi contoh dengan cara pengabuan kering pada suhu 450 °C yang dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam. Logam yang terlarut dihitung menggunakan alat Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) dengan panjang gelombang maksimal 228,8 nm untuk Cd dan 283,3 nm untuk Pb.

A.11.1.2 Peralatan

- a) Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) beserta kelengkapannya (lampu katoda Cd dan Pb) terkalibrasi (sebaiknya menggunakan SSA tungku grafit);
- b) Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- c) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- d) Pemanas listrik;
- e) Penangas air;
- f) Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi;
- g) Labu ukur 1 000 mL, 100 mL, dan 50 mL, terkalibrasi;
- h) Gelas ukur kapasitas 10 mL;
- i) Gelas piala 250 mL;
- j) Cawan porselin/platina/kwarsa dengan kapasitas 50 mL - 100 mL;
- k) Botol *polypropylene*; dan
- l) Kertas saring tidak berabu dengan spesifikasi *particle retention liquid* 20-25 μm .

A.11.1.3 Pereaksi

- a) Larutan asam nitrat pekat (HNO_3) 65% (Bj 1,4);
- b) Larutan asam klorida pekat (HCl) 37% (Bj 1,19);
- c) Larutan asam nitrat (HNO_3) 0,1 N;
encerkan 7 mL HNO_3 65% dengan air suling dalam labu ukur 1000 mL dan encerkan sampai tanda garis.
- d) Larutan asam klorida (HCl) 6 N;
encerkan 500 mL HCl 37% dengan air suling dalam labu ukur 1000 mL dan encerkan sampai tanda garis.
- e) Larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Cd;
larutkan 1,000 g Cd dengan 7 mL HNO_3 pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1000 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Cd 1 000 $\mu\text{g/mL}$ siap pakai.
- f) Larutan baku 200 $\mu\text{g/mL}$ Cd;
pipet 10 mL larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Cd ke dalam labu ukur 50 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 200 $\mu\text{g/mL}$ Cd.
- g) Larutan baku 20 $\mu\text{g/mL}$ Cd;
pipet 10 mL larutan baku 200 $\mu\text{g/mL}$ Cd ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 20 $\mu\text{g/mL}$ Cd.
- h) Larutan baku kerja Cd;
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL, 0,5 mL, 1 mL; 2 mL; 4 mL; 7 mL dan 9 mL larutan baku 20 $\mu\text{g/mL}$ kemudian tambahkan 5 mL larutan HNO_3 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 $\mu\text{g/mL}$; 0,1 $\mu\text{g/mL}$; 0,2 $\mu\text{g/mL}$; 0,4 $\mu\text{g/mL}$; 0,8 $\mu\text{g/mL}$; 1,4 $\mu\text{g/mL}$ dan 1,8 $\mu\text{g/mL}$ Cd.
- i) Larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Pb;
larutkan 1,000 g Pb dengan 7 mL HNO_3 pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Pb 1000 $\mu\text{g/mL}$ siap pakai.
- j) Larutan baku 50 $\mu\text{g/mL}$ Pb; dan
pipet 5,0 mL larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Pb ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi Pb 50 $\mu\text{g/mL}$.
- k) Larutan baku kerja Pb;
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL, 0,2 mL; 0,5 mL; 1 mL; 2 mL; 3 mL dan 4 mL larutan baku 50 $\mu\text{g/mL}$ kemudian tambahkan 5 mL larutan HNO_3 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 $\mu\text{g/mL}$; 0,1 $\mu\text{g/mL}$; 0,25 $\mu\text{g/mL}$; 0,5 $\mu\text{g/mL}$; 1,0 $\mu\text{g/mL}$; 1,5 $\mu\text{g/mL}$ dan 2,0 $\mu\text{g/mL}$ Pb.

A.11.1.4 Cara kerja

- a) Timbang 10 g sampai dengan 20 g contoh dengan teliti dalam cawan porselin/ platina/ kuarsa (m);
- b) tempatkan cawan berisi contoh uji di atas penangas listrik dan panaskan secara bertahap sampai contoh uji tidak berasap lagi;
- c) lanjutkan pengabuan dalam tanur pada suhu $(450 \pm 5)^\circ\text{C}$ sampai abu berwarna putih, bebas dari karbon;

- d) apabila abu belum bebas dari karbon yang ditandai dengan warna keabu-abuan, basahkan dengan beberapa tetes air dan tambahkan tetes demi tetes HNO_3 pekat kira-kira 0,5 mL sampai dengan 3 mL;
- e) keringkan cawan di atas penangas listrik dan masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu 450°C kemudian lanjutkan pemanasan sampai abu menjadi putih. Penambahan HNO_3 pekat dapat diulangi apabila abu masih berwarna keabu-abuan;
- f) larutkan abu berwarna putih dalam 5 mL HCl 6 N, sambil dipanaskan di atas penangas listrik atau penangas air sampai kering, kemudian larutkan dengan HNO_3 0,1 N dan masukkan ke dalam labu ukur 50 mL kemudian tepatkan hingga tanda garis dengan air suling (V), jika perlu, saring larutan menggunakan kertas saring, ke dalam botol *polypropylene*;
- g) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- h) baca absorban larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum sekitar 228,8 nm untuk Cd dan 283 nm untuk Pb;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorban sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C); dan hitung kandungan logam dalam contoh.

A.11.1.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan logam, (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

Keterangan:

C adalah kandungan logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/mL}$);
 V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL); dan
 m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

A.11.1.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan logam. Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.11.2 Timah (Sn)

A.11.2.1 Prinsip

Contoh didekstruksi dengan HNO_3 dan HCl kemudian tambahkan KCl untuk mengurangi gangguan. Sn dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang maksimum 235,5 nm dengan nyala oksidasi $\text{N}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2$.

A.11.2.2 Peralatan

- a) Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) beserta kelengkapannya (lampu katoda Sn) terkalibrasi;
- b) Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1°C ;
- c) Penangas air;
- d) Pemanas listrik;
- e) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- f) Labu ukur 1 000 mL, 100 mL, dan 50 mL, terkalibrasi;

- g) Pipet ukur berskala 10 mL kapasitas 5 mL dan 0,1 mL terkalibrasi;
- h) Erlenmeyer 250 mL;
- i) Gelas ukur kapasitas 50 mL; dan
- j) Gelas piala 250 mL.

A.11.2.3 Pereaksi

- a) Larutan kalium klorida (KCl), 10 mg/mL K;
larutkan 1,91 g KCl dengan air menjadi 100 mL.
- b) Asam nitrat (HNO₃) pekat;
- c) Asam klorida (HCl) pekat;
- d) Larutan baku 1 000 µg/mL Sn; dan
larutkan 1,000 g Sn dengan 200 mL asam HCl pekat dalam labu ukur 1 000 mL, tambahkan 200 mL air suling, dinginkan pada suhu ruang dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- e) Larutan baku kerja Sn.
pipet 10 mL HCl pekat dan 1,0 mL larutan KCl ke dalam masing-masing labu ukur 100 mL. Tambahkan masing-masing 0 mL; 0,5 mL; 1,0 mL; 1,5 mL; 2,0 mL dan 2,5 mL larutan baku 1 000 µg/mL Sn dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/mL; 5 µg/mL; 10 µg/mL; 15 µg/mL; 20 µg/mL dan 25 µg/mL Sn.

A.11.2.4 Cara kerja

- a) Timbang 10 g sampai dengan 20 g (m) dengan teliti ke dalam Erlenmeyer 250 mL, tambahkan 30 mL HNO₃ pekat dan biarkan 15 menit;
- b) panaskan perlahan selama 15 menit di dalam lemari asam, hindari terjadinya percikan yang berlebihan;
- c) lanjutkan pemanasan sehingga sisa volume 3 mL sampai dengan 6 mL atau sampai contoh mulai kering pada bagian bawahnya, hindari terbentuknya arang;
- d) angkat erlenmeyer dari penangas listrik, tambahkan 25 mL HCl pekat, dan panaskan sampai selama 15 menit sampai letupan dari uap Cl₂ berhenti;
- e) tingkatkan pemanasan dan didihkan sehingga sisa volume 10 mL sampai dengan 15 mL;
- f) tambahkan 40 mL air suling, aduk, dan tuangkan ke dalam labu ukur 100 mL, bilas erlenmeyer tersebut dengan 10 mL air suling (V);
- g) tambahkan 1,0 mL KCl, dinginkan pada temperatur ruang, tara dengan air suling dan saring;
- h) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) baca absorbanss larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum 235,5 nm dengan nyala oksidasi N₂O-C₂H₂;
- j) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/mL) sebagai sumbu X dan absorbanss sebagai sumbu Y;
- k) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- l) lakukan pengerjaan duplo; dan
- m) hitung kandungan Sn dalam contoh;

A.11.2.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan timah (Sn) (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi timah (Sn) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/mL}$)
 V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);
 m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

A.11.2.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan timah (Sn). Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.11.3 Merkuri (Hg)

A.11.3.1 Prinsip

Reaksi antara senyawa merkuri dengan NaBH_4 atau SnCl_2 dalam keadaan asam akan membentuk gas atomik Hg. Jumlah Hg yang terbentuk sebanding dengan absorbansi Hg yang dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) tanpa nyala pada panjang gelombang maksimum 253,7 nm.

A.11.3.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) yang dilengkapi lampu katoda Hg dan generator uap dingin (*cold vapour*);
- Microwave digester*;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Penangas listrik;
- Pendingin terbuat dari borosilikat, diameter 12 mm - 18 mm, tinggi 400 mm diisi dengan cincin Raschig setinggi 100 mm, dan dilapisi dengan batu didih berdiameter 4 mm di atas cincin setinggi 20 mm;
- Labu destruksi 250 mL berdasar bulat;
- Labu ukur 1000 mL, 500 mL, dan 100 mL terkalibrasi;
- Gelas ukur 25 mL; dan
- Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi;

A.11.3.3 Pereaksi

- Asam sulfat (H_2SO_4) 9 M;
- Asam nitrat (HNO_3) 7 M;
- Batu didih;
- Campuran asam nitrat (HNO_3) : asam klorat (HClO_4) (1:1);
- Hidrogen peroksida (H_2O_2);
- Larutan natrium molibdat 2%.
- Larutan pereduksi;
campurkan 50 mL H_2SO_4 dengan 300 mL air suling dalam gelas piala 500 mL dan dinginkan sampai suhu ruang kemudian tambahkan 15 g NaCl, 15 g hidroksilamin sulfat, dan 25 g SnCl_2 . Pindahkan kedalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Larutan NaBH_4 ;
larutkan 3 g serbuk NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling dalam labu ukur 500 mL.
- Larutan pengencer;
masukkan 300 mL sampai dengan 500 mL air suling kedalam labu ukur 1 000 mL dan tambahkan 58 mL HNO_3 kemudian 67 mL H_2SO_4 . Encerkan dengan air suling sampai tanda garis dan kocok.
- Larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Hg;

larutkan 0,1354 g HgCl_2 dengan kira-kira 25 mL air suling dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis.

- k) Larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ Hg; dan
Pipet 1 mL larutan baku 1000 mg/l Hg ke dalam labu ukur 1000 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 1 mg/l.
- l) Larutan baku kerja Hg;
Pipet masing-masing 0,25 mL; 0,5 mL; 1 mL; dan 2 mL larutan baku 1 mg/l ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,0025 $\mu\text{g/mL}$; 0,005 $\mu\text{g/mL}$; 0,01 $\mu\text{g/mL}$; 0,02 $\mu\text{g/mL}$ Hg.

A.11.3.4 Cara kerja

A.11.3.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g contoh (m) dengan teliti ke dalam labu destruksi dan tambahkan 25 mL H_2SO_4 9 M, 20 mL HNO_3 7 M, 1 mL larutan natrium molibdat 2 %, dan 5 butir sampai dengan 6 butir batu didih;
- b) hubungkan labu destruksi dengan pendingin dan panaskan di atas penangas listrik selama 1 jam. Hentikan pemanasan dan biarkan selama 15 menit;
- c) tambahkan 20 mL campuran $\text{HNO}_3 - \text{HClO}_4$ (1:1) melalui pendingin;
- d) hentikan aliran air pada pendingin dan panaskan dengan panas tinggi hingga timbul uap putih. Lanjutkan pemanasan selama 10 menit dan dinginkan;
- e) tambahkan 10 mL air suling melalui pendingin dengan hati-hati sambil labu digoyang-goyangkan;
- f) didihkan lagi selama 10 menit;
- g) matikan pemanas dan cuci pendingin dengan 15 mL air suling sebanyak 3 kali kemudian dinginkan sampai suhu ruang;
- h) pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 100 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- i) pipet 25 mL larutan di atas ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis;
- j) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- k) tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja Hg, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG";
- l) baca absorbanss larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- m) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbanss sebagai sumbu Y;
- n) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- o) lakukan pengerjaan duplo; dan
- p) hitung kandungan Hg dalam contoh.

A.11.3.4.2 Destruksi menggunakan *microwave* atau destruksi sistem tertutup

- a) Timbang 1 g contoh (m) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 mL HNO_3 , 1 mL H_2O_2 kemudian tutup rapat;
- b) masukkan ke dalam *microwave digester* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;

- c) pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 50 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- d) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- e) tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG";
- f) baca absorbanss larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- g) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbanss sebagai sumbu Y;
- h) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- i) lakukan pengerjaan duplo; dan
- j) hitung kandungan Hg dalam contoh;

A.11.3.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan merkuri (Hg) (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V \times X_{fp}$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi merkuri (Hg) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/mL}$);
 V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);
 m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
 fp adalah faktor pengenceran.

A.11.3.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan merkuri (Hg). Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.12 Cemaran arsen (As)

A.12.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan asam menjadi larutan arsen. Larutan As^{5+} direduksi dengan KI menjadi As^{3+} dan direaksikan dengan NaBH_4 atau SnCl_2 sehingga terbentuk AsH_3 yang kemudian dibaca dengan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang maksimum 193,7 nm.

A.12.2 Peralatan

- a) Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) yang dilengkapi dengan lampu katoda As dan generator uap hidrida ("HVG");
- b) Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1°C ;
- c) *Microwave digester* ;
- d) Labu Kjeldahl 250 mL;
- e) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- f) *Burner* atau *bunsen*;
- g) Pemanas listrik;
- h) Labu ukur 1000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- i) Pipet volumetrik 25 mL;
- j) Cawan porselen kapasitas 50 mL;
- k) Gelas ukur 25 mL;

- l) Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi; dan
- m) Labu borosilikat berdasar bulat 50 mL.

A.12.3 Perekasi

- a) Asam nitrat (HNO_3) pekat;
- b) Asam perklorat (HClO_4) pekat;
- c) Natrium boronhidrida (NaBH_4) 4 %;
larutkan 3 g NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling sampai tanda garis dalam labu ukur 500 mL.
- d) Asam klorida (HCl) 8 M;
larutkan 66 mL HCl 37 % kedalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- e) Timah (II) klorida ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 10 %;
timbang 50 g $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ke dalam piala gelas 200 mL dan tambahkan 100 mL HCl 37 %. Panaskan hingga larutan jernih dan dinginkan kemudian tuangkan ke dalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- f) Kalium iodida (KI) 20 %;
timbang 20 g KI ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (larutan harus dibuat langsung sebelum digunakan).
- g) Larutan $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 75 mg/mL;
larutkan 3,75 g MgO dengan 30 mL H_2O secara hati-hati, tambahkan 10 mL HNO_3 , dinginkan dan encerkan hingga 50 mL dengan air suling;
- h) Larutan baku 1000 $\mu\text{g/mL}$ As;
larutkan 1,3203 g As_2O_3 kering dengan sedikit NaOH 20 % dan netralkan dengan HCl atau HNO_3 1:1 (1 bagian asam : 1 bagian air). Masukkan ke dalam labu ukur 1 L dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- i) Larutan baku 100 $\mu\text{g/mL}$ As;
pipet 10 mL larutan baku arsen 1000 $\mu\text{g/mL}$ ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$ As.
- j) Larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ As; dan
pipet 1 mL larutan standar arsen 100 mg/l ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 1 $\mu\text{g/mL}$ As.
- k) Larutan baku kerja As;
pipet masing-masing 1,0 mL; 2,0 mL; 3,0 mL; 4,0 mL dan 5,0 mL larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ As ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,01 $\mu\text{g/mL}$; 0,02 $\mu\text{g/mL}$; 0,03 $\mu\text{g/mL}$; 0,04 $\mu\text{g/mL}$ dan 0,05 $\mu\text{g/mL}$ As.

A.13.4 Cara kerja

A.13.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g sampai 10 g contoh (m) kedalam labu Kjeldahl 250 mL, tambahkan 5 mL sampai 10 mL HNO_3 pekat dan 4 mL sampai 8 mL H_2SO_4 pekat dengan hati-hati;
- b) setelah reaksi selesai, panaskan dan tambahkan HNO_3 pekat sedikit demi sedikit sehingga contoh berwarna coklat atau kehitaman;
- c) tambahkan 2 mL HClO_4 70 % sedikit demi sedikit dan panaskan lagi sehingga larutan menjadi jernih atau berwarna kuning (jika terjadi pengarangan setelah penambahan asam perklorat, tambahkan lagi sedikit HNO_3 pekat);
- d) dinginkan, tambahkan 15 mL H_2O dan 5 mL amonim oksalat jenuh;
- e) panaskan sehingga timbul uap SO_3 di leher labu;

- f) dinginkan, pindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 50 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- g) pipet 25 mL larutan diatas dan tambahkan 2 mL HCl 8 M, 0.1 mL KI 20 % kemudian kocok dan biarkan minimal 2 menit;
- h) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) tambahkan larutan pereduksi (NaBH_4) ke dalam larutan baku kerja As, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG";
- j) baca absorbanss larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 193,7 nm;
- k) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbanss sebagai sumbu Y;
- l) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- m) lakukan pengerjaan duplo; dan
- n) hitung kandungan As dalam contoh.

A.13.4.2 Destruksi menggunakan *microwave* atau destruksi sistem tertutup

- a) Timbang 1 g contoh (m) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 mL HNO_3 , 1 mL H_2O_2 kemudian tutup rapat.
- b) masukkan ke dalam oven *microwave* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- c) setelah dingin, pindahkan larutan destruksi ke dalam labu ukur 25 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- d) pipet 10 mL larutan destruksi ke dalam labu borosilikat berdasar bulat 50 mL, tambahkan 1 mL larutan $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, Uapkan di atas penangas listrik hingga kering dan arangkan. Abukan dalam tanur dengan suhu 450°C (± 1 jam);
- e) dinginkan, larutkan dengan 2,0 mL HCl 8 M, 0.1 mL KI 20 % dan biarkan minimal 2 menit. Tuangkan larutan tersebut ke dalam tabung contoh pada alat;
- f) siapkan NaBH_4 dan HCl dalam tempat yang sesuai dengan yang ditentukan oleh alat;
- g) tuangkan larutan baku kerja As 0,01 $\mu\text{g/mL}$; 0,02 $\mu\text{g/mL}$; 0,03 $\mu\text{g/mL}$; 0,04 $\mu\text{g/mL}$; 0,05 $\mu\text{g/mL}$ serta blanko ke dalam 6 tabung contoh lainnya. Nyalakan burner serta tombol pengatur aliran pereaksi dan aliran contoh;
- h) baca nilai absorbanss tertinggi larutan baku kerja As dan contoh dengan blanko sebagai koreksi;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi As ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbanss sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- k) lakukan pengerjaan duplo; dan hitung kandungan As dalam contoh

A.13.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan arsen (As) (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V \times fp$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi arsen (As) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/mL}$)
- V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);
- m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
- fp adalah faktor pengenceran.

A.12.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan merkuri (Hg). Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.13 Cemarkan mikroba

A.13.1 Persiapan dan homogenisasi contoh untuk uji Angka Lempeng Total dan kapang

A.13.1.1 Prinsip

Pembebasan sel-sel bakteri yang mungkin terlindung oleh partikel makanan dan untuk mengaktifkan kembali sel-sel bakteri yang mungkin viabilitasnya berkurang karena kondisi yang kurang menguntungkan dalam minuman. Persiapan dan homogenisasi contoh bertujuan agar bakteri terdistribusi dengan baik di dalam contoh minuman yang ditetapkan.

A.13.1.2 Peralatan

- Alat homogenisasi yang sesuai (blender) dengan kecepatan putaran 10 000 rpm sampai dengan 12 000 rpm;
- Otoklaf;
- Pemanas listrik;
- Neraca kapasitas 2 000 g terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- Labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- Gelas piala steril;
- Labu erlenmeyer steril;
- Botol pengencer steril;
- Pipet volumetrik steril 10,0 dan 1,0 mL terkalibrasi ;
- Tabung reaksi; dan
- Pisau, sendok, gunting, dan spatula steril.

A.13.1.3 Larutan pengencer untuk Angka Lempeng Total

Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water (BPB):

- | | |
|-----------------------------------|--------|
| - KH ₂ PO ₄ | 34 g |
| - Air suling | 500 mL |

Atur pH dengan NaOH sehingga mencapai pH 7,2 , tepatkan volume sampai 1 000 mL dengan air suling. Sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit, simpan pada refrigerator. Untuk membuat larutan pengencer 1,25 mL larutan stock diencerkan dengan air suling sampai volume 1 000 mL. Larutan tersebut dimasukkan ke dalam botol pengencer sebanyak 450 mL dan tabung reaksi sebanyak 9 mL, kemudian disterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit.

A.13.1.4 Larutan pengencer untuk kapang

Peptone 0,1 %

- | | |
|--------------|-----|
| - Peptone | 1 g |
| - Air suling | 1 L |

A.13.1.5 Homogenisasi contoh untuk ALT

- a) Timbang 25 g contoh secara aseptik ke dalam botol pengencer yang telah berisi 225 mL larutan pengencer sehingga diperoleh pengenceran 1:10; dan
- b) kocok campuran beberapa kali sehingga homogen.

A.13.1.6 Homogenisasi contoh untuk kapang

- a) Timbang 50 g contoh secara aseptik ke dalam botol pengencer yang telah berisi 450 mL larutan pengencer sehingga diperoleh pengenceran 1:10; dan
- b) kocok campuran beberapa kali sehingga homogen

A.13.2 Angka lempeng total**A.13.2.1 Prinsip**

Pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang sesuai selama 72 jam pada suhu $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

A.13.2.2 Peralatan

- a) Lemari pengering (inkubator) $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$ terkalibrasi;
- b) Otoklaf;
- c) Oven/alat sterilisasi kering terkalibrasi;
- d) Alat penghitung koloni (*colony counter*);
- e) Penangas air;
- f) Cawan petri gelas/plastik diameter 15 mm x 90 mm steril; dan
- g) Pipet ukur 10 mL, 5 mL, dan 1 mL steril

A.13.2.3 Pembenihan dan pengencer

- a) *Plate count agar* (PCA)

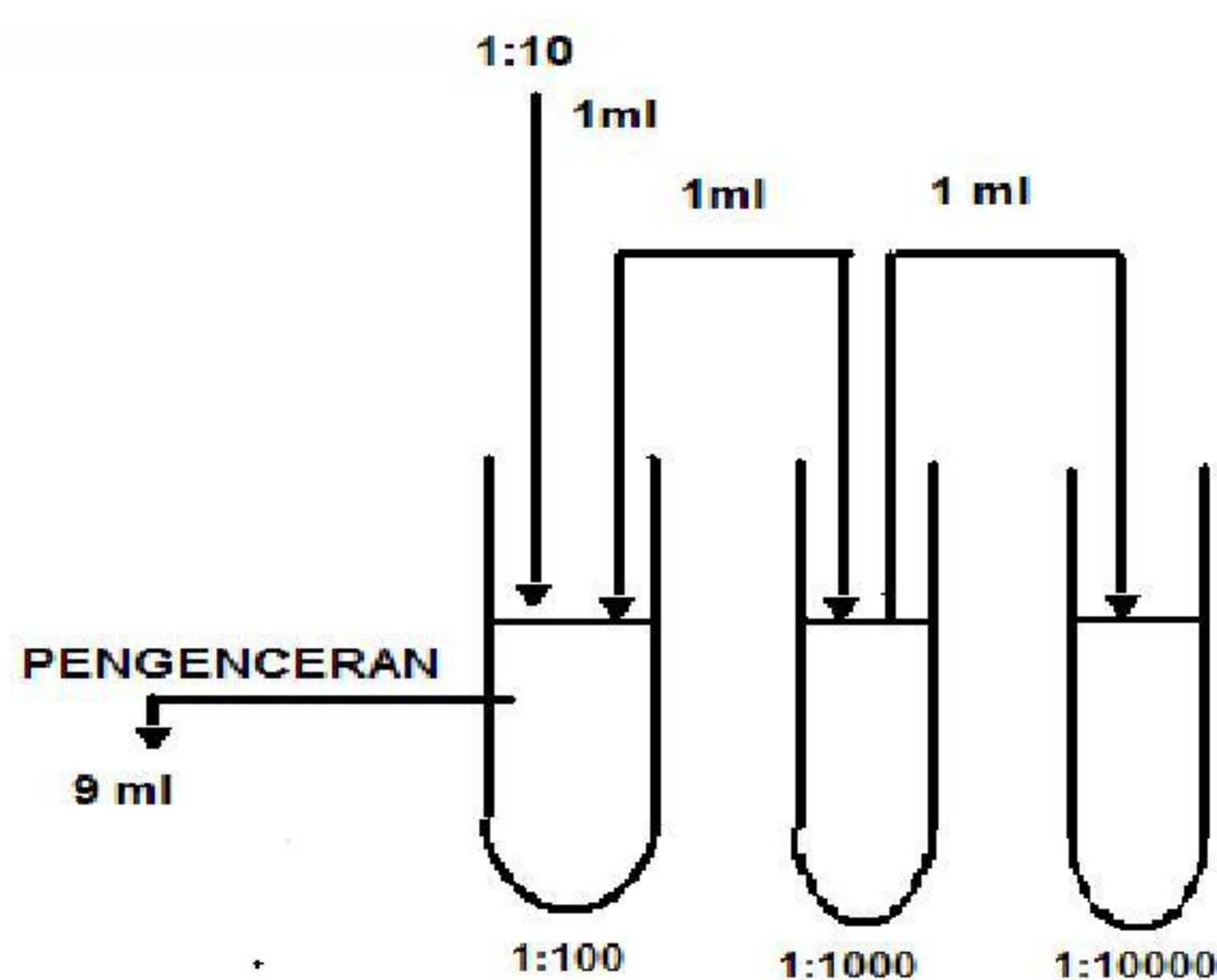
– Tryptone	5 g
– Yeast extract	2,5 g
– Glukosa	1 g
– Agar	15 g
– Air suling	1 000 mL

Larutkan bahan-bahan diatas menjadi 1 000 mL dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan ke dalam botol. Sterilkan dengan menggunakan otoklaf pada suhu $121 ^\circ\text{C}$ selama 15 menit.

A.13.2.4 Cara kerja

- a) Timbang 25 g contoh, masukkan ke dalam Erlenmeyer yang telah berisi 225 mL larutan pengencer hingga diperoleh pengenceran 1 : 10. Kocok campuran beberapa kali hingga homogen. Pengenceran dilakukan sampai tingkat pengenceran tertentu sesuai keperluan seperti pada Gambar A.1
- b) pipet masing-masing 1 mL dari tingkat pengenceran 10^{-1} sampai dengan 10^{-4} ke dalam cawan petri steril secara duplo;
- c) tuangkan 12 mL sampai dengan 15 mL media PCA yang masih cair dengan suhu $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$ ke dalam masing-masing cawan petri;

- d) goyangkan cawan petri dengan hati-hati (putar dan goyang ke depan, ke belakang, ke kanan dan ke kiri) sehingga contoh dan pembedahan tercampur merata dan memadat;
- e) kerjakan pemeriksaan blanko dengan mencampur air pengencer untuk setiap contoh yang diperiksa;
- f) biarkan sampai campuran dalam cawan petri memadat;
- g) masukkan semua cawan petri dengan posisi terbalik ke dalam lemari pengering pada suhu 30 °C selama (72 ± 2) jam; dan
- h) catat pertumbuhan koloni (n) pada setiap cawan petri yang mengandung 25 koloni sampai dengan 250 koloni setelah 72 jam.



Gambar A.1 - Tingkat pengenceran menggunakan larutan pengencer *Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water (BPB) Buffered Peptone Water (BPW)*.

A.13.2.5 Perhitungan

Angka lempeng total (koloni/g) = $n \times F$

Keterangan:

- n adalah rata - rata koloni dari dua cawan petri dari satu pengenceran, dinyatakan dalam koloni per mililiter (koloni/g);
- F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai.

A.13.2.6 Pernyataan hasil

A.13.2.6.1 Cara menghitung

- a) Pilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni setiap cawan petri. Hitung semua koloni dalam cawan petri menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;
- b) jika salah satu dari dua cawan petri terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 koloni atau lebih besar dari 250 koloni, hitung jumlah koloni yang terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;

Contoh :

$$\frac{10^{-2}}{10^{-3}}$$

120	25
105	20

$$ALT = \frac{120 + 105 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 1) \times 10^{-2}]} = 124,9375$$

- c) jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni, hitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran koloni per gram dengan rumus:

$$ALT = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2) \times d]}$$

Keterangan:

- C adalah jumlah koloni dari tiap-tiap petri;
 n_1 adalah jumlah petri dari pengenceran pertama yang dihitung;
 n_2 adalah jumlah petri dari pengenceran kedua;
d adalah pengenceran pertama yang dihitung;

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
131	30
143	25

$$ALT = \frac{131 + 143 + 30 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2) \times 10^{-2}]} = 164,3357$$

- d) jika jumlah koloni dari masing-masing petri lebih dari 25 koloni nyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan;
- jika jumlah koloni per cm^2 kurang dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya sebagai jumlah perkiraan : jumlah bakteri dikalikan faktor pengenceran.

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}	Jumlah bakteri perkiraan
~	640	$1000 \times 640 = 640.000 (6,4 \times 10^5)$

- jika jumlah koloni per cm^2 lebih dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya: area x faktor pengenceran x 100 contoh rata-rata jumlah koloni 110 per cm^2

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}	area (cm^2)	jumlah bakteri perkiraan
~	7150	65	$> 65 \times 10^3 \times 100 = > 6500.000 (6,5 \times 10^6)$
~	6490	59	$> 59 \times 10^3 \times 100 = > 5900.000 (5,9 \times 10^6)$

- e) jika jumlah koloni dari masing-masing koloni yang tumbuh pada cawan petri kurang dari 25 koloni, maka nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari 25 koloni dikalikan pengenceran yang terendah; dan
- f) menghitung koloni perambat;
- Perambatan pada koloni ada 3 macam, yaitu :
- merupakan rantai yang tidak terpisah;
 - perambat yang terjadi diantara dasar cawan petri dan pembenihan; dan
 - perambatan yang terjadi pada pinggir atau penukaran pembenihan.

Jika terjadi hanya satu perambatan (seperti rantai) maka koloni dianggap satu. Jika terbentuk satu atau lebih rantai terbentuk dan berasal dari sumber yang terpisah-pisah, maka uap sumber dihitung sebagai satu koloni.

- g) jika tidak ada koloni yang tumbuh pada cawan petri, nyatakan hasil sebagai nol koloni per gram dikalikan dengan faktor pengenceran terendah (< 10).

A.13.2.6.2 Cara membulatkan angka

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka pertama dan kedua (dimulai dari kiri),

- Jika angka ketiga lebih besar dari 5, maka bulatkan ke atas;
contohnya : 528 dilaporkan sebagai 530 penulisannya $5,3 \times 10^2$
- jika angka ketiga kurang dari 5, maka bulatkan kebawah; dan
contohnya : 523 dilaporkan sebagai 520 penulisannya $5,2 \times 10^2$
- jika angka ketiga sama dengan 5, maka bulatkan sebagai berikut
 - bulatkan ke atas jika angka kedua merupakan angka ganjil; dan
contohnya : 575 dilaporkan sebagai 580 penulisannya $5,8 \times 10^2$
 - bulatkan ke bawah jika angka kedua merupakan angka genap
contohnya : 565 dilaporkan sebagai 560 penulisannya $5,6 \times 10^2$

A.13.3 Kapang

A.13.3.1 Prinsip

Pertumbuhan kapang dalam media yang sesuai, setelah diinkubasikan pada suhu $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$ selama 5 hari.

A.13.3.2 Peralatan

- Inkubator $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$ terkalibrasi;
- Otoklaf;
- Penangas air $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- pH meter
- Alat penghitung koloni;
- Cawan petri 15 mm x 100 mm steril;
- Pipet ukur 10 mL dan 1 mL; dan

A.13.3.3 Pembenihan, pengencer dan pereaksi

- Agar *Dichloran rose bengal chloramphenicol* (DRBC) ;
- Agar *Dichloran 18 % glycerol* (DG 18);
- Larutan pepton 0,1 %
- Larutan antibiotik:
antibiotik ditambahkan dalam media kapang untuk mencegah pertumbuhan bakteri. *Chloramphenicol* adalah salah satu pilihan antibiotik, karena stabil saat diotoklaf. Kandungan antibiotik yang diizinkan adalah 100 mg /L media. Jika tampak pertumbuhan bakteri, siapkan media dengan penambahan 50 mg/L *chloramphenicol* sebelum otoklaf dan 50 mg/L *chlortetracycline* steril saat media mulai di kondisikan, tepat sebelum menuang media dalam cawan.

A.13.3.4 Cara kerja

- Buat tingkat pengenceran dari 10^{-1} sampai dengan 10^{-6} , dengan menggunakan larutan pepton 0,1 %;

- b) Persiapan media dalam cawan dapat dilakukan dengan salah satu metode di bawah ini, yaitu :
- Metode sebar (media DRBC atau DG 18), penggunaan media DG 18 lebih sesuai untuk contoh uji yang mempunyai aw kurang dari 0,95
 - Metode tuang (media DG 18) :
 - Pipet 1,0 mL masing-masing pengenceran ke dalam cawan petri dan sesegera mungkin tuangkan 20 mL sampai dengan 25 mL media
 - Campurkan dengan menggoyang cawan secara perlahan searah jarum jam, kemudian berlawanan arah jarum jam selama 1 menit sampai dengan 2 menit; dan
 - Biarkan hingga campuran dalam cawan petri memadat.
- c) Masukkan semua cawan petri dengan posisi tidak terbalik ke dalam inkubator dan inkubasi pada ruang gelap bersuhu 25 °C selama 5 hari. Jangan menumpuk cawan lebih dari 3 tumpukan. Biarkan cawan dan jangan merubah posisinya;
- d) hitung koloni pada cawan sesudah 5 hari inkubasi. Jika setelah 5 hari tidak ada yang tumbuh, tambahkan waktu inkubasi selama 48 jam. Jangan menghitung cawan-cawan sampai waktu inkubasi berakhir, karena merubah posisi cawan dapat mengakibatkan pertumbuhan sekunder dari spora; dan
- e) nyatakan hasil perhitungan sebagai jumlah kapang per gram contoh;

A.13.3.5 Pernyataan hasil

A.13.3.5.1 Cara menghitung

Pilih cawan petri dari suatu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 10 koloni sampai dengan 150 koloni setiap cawan petri. Hitung koloni kapang sesuai dengan A.13.2.6.1

A.13.3.5.2 Cara membulatkan angka

Cara membulatkan angka pada hasil perhitungan kapang sesuai dengan A.13.2.6.2

Bibliografi

Association of Official Analytical Chemistry. 2006. *AOAC Official Method 934.01, Moisture in Tea*, Chapter 30.1.34.

British Standard BS 6049-4:1998 ISO 1575:1987 Methods of test for tea Part 4 : *Determination of total ash*

ISO 3720: 2011(E) *Black tea – Definition and basic requirements*.

ISO 1576 : 1988 (E). *Tea - Determination of water-soluble ash and water insoluble ash*.

International Standards ISO 1577 : 1987 (E). *Tea – Determination of acid-insoluble ash*.

ISO 1578 -1975 (E). *Tea – Determination of alkalinity of water-soluble ash*.

ISO 15598 : 1999 (E) *Tea – Determination of crude fibre content*.

ISO 9768 : 1994 (E). *Tea – Determination of water extract*

Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 971.21, Mercury in Foods, Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, 18th Edition, Chapter 9.2.22.

Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 986.15, Arsenic, Cadmium, Lead, Selenium, and Zinc in Human and Pet Foods, Multielement Method*, 18th Edition, Chapter 9.1.01.

Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 999.11, Lead, Cadmium, Copper, Iron, and Zinc*. 18th Edition, Chapter 9.1.09.

International Standards ISO 4833:2003 (E). *Microbial of Food and Animal Feeding stuffs- Horizontal Method for The Enumeration of Microorganism- Colony Count Technique at 30 °C*

Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 2001. *Yeasts, Molds, and Mycotoxins*. Chapter 18.

International Standards ISO 14502-1:2005. *Determination of Substances Characteristic of Green and Black Tea – Part 1: Content of Total Polyphenols in Tea – Coloric Method Using Folin-CioCalteu Reagent*.

SNI 2009. Batasan maksimum cemaran mikroba dalam pangan. SNI: 7338:2009.

SNI 2009. Batasan maksimum cemaran logam berat dalam pangan. SNI: 7387:2009.